



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06125783 A**(43) Date of publication of application: **10.05.94**

(51) Int. Cl

C12P 21/08
A61K 39/395
A61K 39/395
C12N 15/13
/(C12P 21/08 , C12R 1:91)

(21) Application number: **03359808**(22) Date of filing: **28.12.91**(71) Applicant: **CHEMO SERO THERAPEUT RES
INST**

(72) Inventor: **MAEDA HIROAKI**
KURUMI KAZUHIKO
EDA YASUYUKI
SHIOSAKI KOUICHI
NAGATOMI KIYOSHI
TOKIYOSHI YUKIO

**(54) RECOMBINANT ANTI-HIV ANTIBODY AND ITS
PREPARATION**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a gene fraction encoding a versatile region of an antibody having neutralizing activity against human immunodeficiency virus (HIV) and to prepare a recombinant anti-HIV antibody manifested by using the gene.

CONSTITUTION: A specific nucleic acid sequence of a gene fraction encoding a versatile region of H-chain and L-chain of an antibody having neutralizing activity against HIV is obtained. DNA synthesized from the base

sequence as a base is artificially fused with a gene encoding human immunoglobulin to give a mouse human chimera antibody having neutralizing activity against HIV and a mouse human modified antibody.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-125783

(43)公開日 平成6年(1994)5月10日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
A 6 1 K 39/395		S 9284-4C		
	ADY D	9284-4C		
C 1 2 N 15/13	ZNA			
		8931-4B		
			C 1 2 N 15/ 00	A
			審査請求 未請求 請求項の数22(全 22 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-359808

(22)出願日 平成3年(1991)12月28日

(71)出願人 000173555

財団法人化学及血清療法研究所
熊本県熊本市清水町大窪668番地

(72)発明者 前田 浩明

熊本県熊本市武蔵ヶ丘2丁目142公団4-609

(72)発明者 来海 和彦

熊本県熊本市鶴羽田町1161

(72)発明者 江田 康幸

熊本県菊池郡合志町大字豊岡2012-88

(72)発明者 塩先 巧一

熊本県菊池郡合志町幾久富1866-734

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 組換え抗HIV抗体およびその調製方法

(57)【要約】

【目的】 ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する中和活性を有する抗体の変換領域をコードする遺伝子断片、この遺伝子を用いて発現された組換え抗HIV抗体およびその調製法を提供する。

【構成】 HIVに対する中和活性を有する抗体のH鎖及びL鎖の変換領域をコードする遺伝子断片の特異的核酸配列を得、この塩基配列をもとに合成したDNAとヒト免疫グロブリンをコードする遺伝子とを人為的に融合させることによりHIVに対する中和活性を有するマウス・ヒトキメラ抗体並びにマウス・ヒト改変抗体を得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 マウス抗体由来のアミノ酸配列とヒト抗体由来のアミノ酸配列からなる遺伝子組換え抗体H鎖であって、可変領域の相補性決定領域（CDR1～CDR3）のアミノ酸配列が下記の配列であることを特徴とし、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）に対する中和活性を有する組換え抗HIV抗体H鎖。

CDR1：Lys-Tyr-Gly-Met-Asn

CDR2：Tyr-Lys-Asn-Thr-Asn-Thr-Gly-Glu-Ser-Thr-His-Val-Glu-Glu-Phe-Lys-Gly

CDR3：Glu-Tyr-Asp-Tyr-Asp-Gly-Gly-Phe-Ser-Tyr

【請求項2】 可変領域の相補性決定領域CDR1に隣接するFR1のC末側1個のアミノ酸がスレオニン（Thr）であり、CDR2に隣接するFR2のC末側4個のアミノ酸配列がLys-Trp-Met-Glyであり、CDR2に隣接するFR3のN末側5個のアミノ酸配列がArg-Val-Thr-Met-Serであり、さらにCDR3に隣接するFR3のC末側1個のアミノ酸がアルギニン（Arg）である請求項1の組換え抗HIV抗体H鎖。

【請求項3】 該組換え抗HIV抗体H鎖が改変抗体であって、可変領域の全アミノ酸配列が、配列表：配列番号5に記載のアミノ酸順位1から119のアミノ酸配列である請求項1の組換え抗HIV抗体H鎖。

【請求項4】 該組換え抗HIV抗体H鎖がキメラ抗体であって、可変領域の全アミノ酸配列が、配列表：配列番号1に記載のアミノ酸順位1から119のアミノ酸配列である請求項1の組換え抗HIV抗体H鎖。

【請求項5】 マウス抗体由来のアミノ酸配列とヒト抗体由来のアミノ酸配列からなる遺伝子組換え抗体L鎖であって、可変領域の相補性決定領域（CDR1～CDR3）のアミノ酸配列が下記の配列であることを特徴とし、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）に対する中和活性を有する組換え抗HIV抗体L鎖。

CDR1：Lys-Ala-Ser-Gln-Asp-Val-Gly-Ala-Asp-Val-Ala

CDR2：Trp-Ala-Ser-Thr-Arg-His-Thr

CDR3：Gln-Gln-Tyr-Ser-Ser-Phe-Pro-Leu-Thr

【請求項6】 該組換え抗HIV抗体L鎖が改変抗体であって、可変領域の全アミノ酸配列が、配列表：配列番号6に記載のアミノ酸順位1から107のアミノ酸配列である請求項5の組換え抗HIV抗体L鎖。

【請求項7】 該組換え抗HIV抗体L鎖がキメラ抗体であって、可変領域の全アミノ酸配列が、配列表：配列番号2に記載のアミノ酸順位1から107のアミノ酸配列である請求項5の組換え抗HIV抗体L鎖。

【請求項8】 前記請求項1の組換え抗HIV抗体H鎖と前記請求項5の組換え抗HIV抗体L鎖とからなる組換え抗HIV抗体。

【請求項9】 マウス抗体由来のアミノ酸配列とヒト抗体由来のアミノ酸配列からなる遺伝子組換え抗体H鎖であって、可変領域の相補性決定領域（CDR1～CDR3）の

ミノ酸配列が下記の配列であることを特徴とし、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）に対する中和活性を有する組換え抗HIV抗体H鎖。

CDR1：Glu-Tyr-Thr-Met-His

CDR2：Gly-Ile-Asn-Pro-Asn-Asn-Gly-Asp-Thr-Ser-Tyr-Thr-Gln-Lys-Phe-Lys-Gly

CDR3：Pro-Tyr-Tyr-Ala-Tyr-Ala-Ile-Asp-Ser

【請求項10】 可変領域の相補性決定領域CDR1に隣接するFR1のC末側1個のアミノ酸がスレオニン（Thr）であり、CDR2に隣接するFR2のC末側2個のアミノ酸配列がIle-Glyであり、CDR2に隣接するFR3のN末側6個のアミノ酸配列がLys-Ala-Thr-Met-Thr-Valであり、さらにCDR3に隣接するFR3のC末側1個のアミノ酸がスレオニン（Thr）である請求項9の組換え抗HIV抗体H鎖。

【請求項11】 該組換え抗HIV抗体H鎖が改変抗体であって、可変領域の全アミノ酸配列が、配列表：配列番号7に記載のアミノ酸順位1から118のアミノ酸配列である請求項9の組換え抗HIV抗体H鎖。

【請求項12】 該組換え抗HIV抗体H鎖がキメラ抗体であって、可変領域の全アミノ酸配列が、配列表：配列番号3に記載のアミノ酸順位1から118のアミノ酸配列である請求項9の組換え抗HIV抗体H鎖。

【請求項13】 マウス抗体由来のアミノ酸配列とヒト抗体由来のアミノ酸配列からなる遺伝子組換え抗体L鎖であって、可変領域の相補性決定領域（CDR1～CDR3）のアミノ酸配列が下記の配列であることを特徴とし、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）に対する中和活性を有する組換え抗HIV抗体L鎖。

CDR1：Lys-Ala-Ser-Gln-Ser-Val-Asp-Tyr-Asp-Gly-Asp-Ser-Tyr-Met-Asn

CDR2：Ala-Ala-Ser-Asn-Leu-Glu-Ser

CDR3：Gln-Gln-Ser-Asn-Glu-Asp-Pro-Trp-Thr

【請求項14】 該組換え抗HIV抗体L鎖が改変抗体であって、可変領域の全アミノ酸配列が、配列表：配列番号8に記載のアミノ酸順位1から111のアミノ酸配列である請求項13の組換え抗HIV抗体L鎖。

【請求項15】 該組換え抗HIV抗体L鎖がキメラ抗体であって、可変領域の全アミノ酸配列が、配列表：配列番号4に記載のアミノ酸順位1から111のアミノ酸配列である請求項13の組換え抗HIV抗体L鎖。

【請求項16】 前記請求項9の組換え抗HIV抗体H鎖と前記請求項13の組換え抗HIV抗体L鎖とからなる組換え抗HIV抗体。

【請求項17】 ヒト免疫不全ウイルス（HIV）に対する中和活性を有する抗体のH鎖可変領域もしくはその一部をコードするDNA断片であって、その核酸配列が、配列表：配列番号1に記載の核酸順位1から357の核酸配列またはその一部の核酸配列であるDNA断片。

【請求項18】 ヒト免疫不全ウイルス（HIV）に対する中和活性を有する抗体のL鎖可変領域もしくはその一部をコードするDNA断片であって、その核酸配列が、配列表：配列番号2に記載の核酸順位1から321の核酸配列またはその一部の核酸配列であるDNA断片。

【請求項19】 ヒト免疫不全ウイルス（HIV）に対する中和活性を有する抗体のH鎖可変領域もしくはその一部をコードするDNA断片であって、その核酸配列が、配列表：配列番号3に記載の核酸順位1から354の核酸配列またはその一部の核酸配列であるDNA断片。

【請求項20】 ヒト免疫不全ウイルス（HIV）に対する中和活性を有する抗体のL鎖可変領域もしくはその一部をコードするDNA断片であって、その核酸配列が、配列表：配列番号4に記載の核酸順位1から333の核酸配列またはその一部の核酸配列であるDNA断片。

【請求項21】 請求項17のDNA断片と請求項18のDNA断片を用い、さらにヒト免疫グロブリンをコードするDNA断片を用いて、少なくとも相補性決定領域がマウス抗体由来のアミノ酸配列である組換え抗体を発現可能な発現ベクターを構築し、これを動物細胞内で発現させ、該抗体を回収することを特徴とする組換え抗HIV抗体の調製方法。

【請求項22】 請求項19のDNA断片と請求項20のDNA断片を用い、さらにヒト免疫グロブリンをコードするDNA断片を用いて、少なくとも相補性決定領域がマウス抗体由来のアミノ酸配列である組換え抗体を発現可能な発現ベクターを構築し、これを動物細胞内で発現させ、該抗体を回収することを特徴とする組換え抗HIV抗体の調製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はヒト免疫不全ウイルス（HIV）に起因するエイズ（AIDS）の治療および予防に期待できる新規な組換え抗HIV抗体に関する。さらに詳細には、マウス免疫グロブリン遺伝子とヒト免疫グロブリン遺伝子から遺伝子組換え技術を用いて発現された、HIVに対して中和活性を有する組換え抗HIV抗体（改変抗体およびキメラ抗体）ならびにその新規調製方法に関する。さらには、このような有用な組換え抗体の発現に有効なH鎖及びL鎖の可変領域をコードするDNA断片に関する。

【0002】

【発明の背景】 後天性免疫不全症候群(acquired immune deficiency syndrome: AIDS) は、レトロウイルスに属するヒト免疫不全ウイルス（HIV）に起因するウイルス性疾患である。この疾患は1981年にアメリカで発見されて以来急速に世界中に広がりを見せているが、有効な

ワクチンや治療法はまだ提供されていない。

【0003】 このような状況の中で、輸血によってHIV陽性となったサラセミアの患者グループと小児のAIDS及びARC（AIDS関連症候群）のグループにおいて、その臨床と中和抗体の関連についての報告がある[R. Guroffら, J. Immunol., 138, p3731, (1987) ; R. Guroffら, Pediatric Research, inpress]。いずれの場合でも中和抗体の検出できる症例においては臨床症状も軽く良好であるが、中和抗体が検出できない症例においては臨床症状が悪化していることが報告されており、in vivo おける中和抗体の有効性を示唆している。このように抗HIV中和抗体はin vivo における感染の拡大防止や感染細胞の排除に役立つ可能性があり、現在臨床で用いられている抗ウイルス剤等との併用により更に高い効果が期待される。

【0004】

【従来技術】 上記のような抗HIV中和抗体をAIDSの患者から直接採取・調製するやり方もあるが、この方法は、倫理的な問題や原材料入手、バイオハザードの問題など数多い困難が予想される。そこで、このような高力価血清の代替品としてHIVウイルス中和活性を有するモノクローナル抗体の使用が考えられる。モノクローナル抗体作製に関する基本的な技術はすでにマウス型モノクローナル抗体において確立されているが、マウス抗体は副作用（マウスモノクローナル抗体をヒトに使用した場合、異種タンパクとしてアナフィラキシーショックや血清病などの副作用を起こすことが考えられる）等の点からその臨床応用が難しく、最終的にはヒトモノクローナル抗体の使用が望ましい。

【0005】 しかしながら、ヒトモノクローナル抗体の調製においては、目的の特異性を有する抗体を調製する点において克服する問題が多く、マウス型モノクローナル抗体の調製と比べて現実的には非常に困難を伴う。このような問題を克服すべく、抗体の特異性を特徴づける可変領域はマウス抗体由来のアミノ酸配列を有し、定常領域のアミノ酸配列をヒト抗体由来のものにした、遺伝子組換え技術を応用したキメラモノクローナル抗体の調製手法が最近報告されている。

【0006】 このキメラモノクローナル抗体は、可変（V）領域の原料となるマウスモノクローナル抗体を産生するマウスハイブリドーマからクローニングしたV遺伝子と、定常（C）領域の原料となるヒト抗体産生細胞等のヒト細胞からクローニングしたC遺伝子とを結合させたマウス（V）-ヒト（C）キメラ抗体遺伝子を動物細胞あるいは微生物細胞等で発現させ、その培養上清中に得られるものである。キメラ抗体に関するいくつかの報告がすでに見受けられ【特開昭60-155132、特開昭61-47500】、本発明者らも既にキメラ抗体の作製に成功している【特開平2-2352】。さらに、このキメラ抗体の考え方を一層進めた改変抗体の作製も報告【特開昭62-296

890] されている。

【0007】免疫グロブリン遺伝子についての解析は、最近の遺伝子操作技術の急速な発展に伴って急速に進みつつある。免疫グロブリン遺伝子は抗原との結合部位である可変領域（V領域）遺伝子と補体や特定の細胞と相互作用等に関与した生理活性を持つ定常領域（C領域）遺伝子により形成されていることがよく知られている。さらに、V領域遺伝子は、数あるV遺伝子断片群、D遺伝子断片群（L鎖ではまだ見つかっていない）及びJ遺伝子断片群の中からそれぞれ1個が選ばれこの順序で並んで結合することによって形成される。さらに、結合した遺伝子断片（V領域遺伝子）は体細胞突然変異によって細かな修飾を受け変化する。即ち、抗体の特異性はH鎖とL鎖のV領域遺伝子の中の各遺伝子断片の組合せと体細胞突然変異によって決定される【利根川進, Nature, 307, p575 (1983); 本庶佑, Annual Rev. Immunol. 1, p499 (1983) 参照】。従って、ある特定の抗原に対しては、特定のH鎖VDJ遺伝子断片と特定のL鎖のVJ遺伝子断片の組合せさらには特定の体細胞突然変異があると考えられる。しかも、これらの遺伝子断片の組合せやその核酸塩基あるいはアミノ酸配列を抗原側の構造、核酸塩基あるいはアミノ酸配列等から類推することは非常に困難であり、実際に抗体を産生している細胞から抗体遺伝子あるいは抗体蛋白質を単離しなくては決定できない。このように、抗体分子の可変領域のアミノ酸配列は抗原決定基毎に異なり、可変領域そのものは抗原ごとに全く異なるアミノ酸配列を有する。

【0008】本発明の対象となる組換え抗HIV抗体については、既に本発明者等が抗HIV中和組換え抗体として0.5β組換え抗体を発表している【特開平2-2352】が、該組換え抗体はHTLV-IIIBを特異的に中和することはできるが、疫学上多いとされるHTLV-IIIMNを中和することはできなかった。前述のように、組換え抗体の作製には、目的の抗原と結合能を持つ抗体分子の可変領域のアミノ酸配列をコードする遺伝子を見いだすことが非常に重要な要素となっており、本発明の対象となるHIV、特にHTLV-IIIMNに対して中和活性を持つ抗体の可変領域のアミノ酸配列をコードする遺伝子を見いだすことが困難であったために、これまでこのHTLV-IIIMNに結合しこれを実質的に中和する組換え抗体が得られたという報告はない。

【0009】

【発明の目的】このような状況において、本発明者らはHIV（HTLV-IIIMN）に対して中和活性を有するモノクローナル抗体を産生する細胞（ハイブリドーマ）から、該抗体の可変領域をコードする遺伝子を分離することに成功し、さらにこれを用いてマウス-ヒト組換え抗体の発現を試みた結果、HIV（HTLV-IIIMN）に対して中和活性を有する組換え抗HIV抗体の作製に成功し、本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、これまでに

一切報告されていない抗HIV中和抗体の可変領域をコードする遺伝子を提供し、これを用いて形質転換細胞内で発現される組換え抗HIV抗体を提供するものであり、この新規抗HIV組換え抗体からなる副作用の少ないAIDS診断薬・治療薬・予防薬の開発を可能にすることを目的とするものである。

【0010】

【発明の構成および効果】本発明に用いる抗HIV（HTLV-IIIMN）マウスモノクローナル抗体産生細胞は、これまでに確立されているマウスモノクローナル抗体の作製技術を用いて作製される。例えば、マウスを種々の適当な免疫原、例えばHIV（HTLV-IIIMN）産生細胞から得られるウイルス粒子、もしくは精製外皮膜糖蛋白質gp120、もしくは遺伝子組換え技術を用いて調製される組換えペプチド、好ましくはgp120のアミノ酸配列第247-370に対応する組換えペプチド、もしくは該ウイルス蛋白のアミノ酸配列に基づいて調製される好適な合成ペプチド、好ましくはgp120のアミノ酸配列第303-325に対応する合成ペプチド等で免疫し、得られた脾臓細胞をマウスのミエローマ細胞と融合させ、得られたハイブリドーマから、精製外皮膜糖蛋白質gp120、もしくは前記組換えペプチド、もしくは前記合成ペプチドに反応する細胞を選択し、該細胞を培養することによって調製することができる。更に、このようにして得られた抗HIVマウスモノクローナル抗体産生細胞の中からHIVに対して中和活性を有するモノクローナル抗体を産生している細胞を選択する。HIVの場合その特有の性質からこのような中和活性を有するモノクローナル抗体を得ることは容易なことではないが、そのような細胞株として本発明者等はHIV（HTLV-IIIMN）に対して中和活性を有する抗体を産生するハイブリドーマμ39.1あるいはμ5.5細胞の確立に成功しており【特願平2-188300】、これらが本発明に用いる最も好ましい細胞株としてあげられる。

【0011】本発明の可変領域をコードする遺伝子断片は、このような抗HIV中和モノクローナル抗体産生細胞より分離され、解析された遺伝子配列である。しかしながら前にも述べたように、このような細胞は目的の抗HIV抗体に特異的なV領域をコードする遺伝子の他に、数多いV領域構成遺伝子群を有している（例えば、マウス抗体の特異性を決定するVH鎖のV遺伝子群だけでも少なくとも100種以上異なる遺伝子を持ち、D遺伝子群として11種以上、J遺伝子群として4種の遺伝子を持っている。同様にVκ鎖のV遺伝子群としては約300種以上の遺伝子、J遺伝子群としては4種の遺伝子を保有している）ため、細胞の持つ染色体遺伝子の中から、目的の抗HIV抗体に特異的なV領域をコードしている遺伝子を分離することが必要である。V領域遺伝子は通常の遺伝子操作技術により単離することができる。例えば、その細胞の染色体DNAから常法【例えば、T. Maniatis "Molecular Cloning" Cold Spring Harbor L

ab. (1982) 参照]に従ってV領域遺伝子をクローニングする方法、あるいは、その細胞のmRNAを材料として常法 [例えば、D. M. Glover編集 "DNA cloning Vol. I" IRL press (1985)] によりcDNAを合成しV領域遺伝子をクローニングする方法である。いずれの方法も、V領域遺伝子クローニングの為のプロープとして、すでに報告されているマウス免疫グロブリン遺伝子の核酸塩基配列 [例えば、坂野ら、Nature, 286, p676, (1980); E. E. Maxら、J. Biol. Chem., 256, p5116, (1981)] を参照して合成したDNAプロープ等を利用することが出来る。また、PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) を利用したクローニングも可能である [R. Orlandi, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3833 (1989); W. D. Huse, et al., Science, 246, 1275 (1989)]。

【0012】このようにしてクローニングされたV領域遺伝子をキメラ抗体作製法 [特開平2-2352] や改変抗体作製法 [特開昭62-296890] のような種々方法により遺伝子解析を行なった。その結果、抗HIV抗体V領域をコードする本発明の遺伝子断片は、その特異的な遺伝子配列として、H鎖をコードする遺伝子に、

(H-a)

(a) Lys-Tyr-Gly-Met-Asn

(b) Tyr-Lys-Asn-Thr-Asn-Thr-Gly-Glu-Ser-Thr-His-Val-Glu-Glu-Phe-Lys-Gly

(c) Glu-Tyr-Asp-Tyr-Asp-Gly-Gly-Phe-Ser-Tyr
または、

(H-b)

(a) Glu-Tyr-Thr-Met-His

(b) Gly-Ile-Asn-Pro-Asn-Asn-Gly-Asp-Thr-Ser-Tyr-Thr-Gln-Lys-Phe-Lys-Gly

(c) Pro-Tyr-Tyr-Ala-Tyr-Ala-Ile-Asp-Ser
のアミノ酸配列をコードする遺伝子をその一部に含み、またL鎖をコードする遺伝子に、

(L-a)

(a) Lys-Ala-Ser-Gln-Asp-Val-Gly-Ala-Asp-Val-Ala

(b) Trp-Ala-Ser-Thr-Arg-His-Thr

(c) Gln-Gln-Tyr-Ser-Ser-Phe-Pro-Leu-Thr

または、

(L-b)

(a) Lys-Ala-Ser-Gln-Ser-Val-Asp-Tyr-Asp-Gly-Asp-Ser-Tyr-Met-Asn

(b) Ala-Ala-Ser-Asn-Leu-Glu-Ser

(c) Gln-Gln-Ser-Asn-Glu-Asp-Pro-Trp-Thr

のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列をその一部に有することを特徴とすることが見いだされた。このような上記のH鎖、L鎖に含まれるそれぞれ3種のアミノ酸配列は、抗体分子の結合能を決定する重要なアミノ酸配列と考えられ、このようなアミノ酸配列が、HIVに対する中和活性を有する抗体分子の機能と密接に関連しているものと考えられた。すなわち、Kabatらにより報告さ

れている抗体遺伝子の一般的解析 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th. ed. U.S. Department of Health and Human Services (1987)] の結果を参照することにより、上記のアミノ酸配列は、本発明の抗HIV抗体の抗体活性を決定する可変領域の相補性決定領域 (CDR1~CDR3) の配列であることが見いだされた。このような抗HIV中和活性を有する抗体分子の可変領域をコードする遺伝子として、H鎖、L鎖それぞれ図1、または図3、図2または図4のアミノ酸配列をコードする遺伝子断片がその好ましい一例として挙げられる。また、そのような遺伝子の具体的な核酸塩基配列の一例としては、H鎖、L鎖それぞれ図1または図3、図2または図4に示された核酸塩基配列が挙げられる。

【0013】このように本発明により提供される上記の核酸配列をもとに、HIVに対して中和活性を有する組換え抗体を調製することが可能となる。すなわち、このような組換え抗体の可変領域をコードする遺伝子として、その相補性決定領域をコードするDNA断片として、上記に示したアミノ酸配列をコードするよう合成DNA等をそれぞれ調製し、これをヒト免疫グロブリンをコードする遺伝子と融合させることにより、目的の組換え抗HIV抗体、すなわち、抗HIVキメラ抗体または抗HIV改変抗体を調製することが可能となる。このようにして調製される本発明の組換え抗HIV抗体は、そのH鎖可変領域の相補性決定領域として下記の配列 (CDR1~CDR3) を有することを特徴とする。

【0014】 (H-A)

CDR1: Lys-Tyr-Gly-Met-Asn

CDR2: Tyr-Lys-Asn-Thr-Asn-Thr-Gly-Glu-Ser-Thr-His-Val-Glu-Glu-Phe-Lys-Gly

30 CDR3: Glu-Tyr-Asp-Tyr-Asp-Gly-Gly-Phe-Ser-Tyr

または

(H-B)

CDR1: Glu-Tyr-Thr-Met-His

CDR2: Gly-Ile-Asn-Pro-Asn-Asn-Gly-Asp-Thr-Ser-Tyr-Thr-Gln-Lys-Phe-Lys-Gly

CDR3: Pro-Tyr-Tyr-Ala-Tyr-Ala-Ile-Asp-Ser

【0015】また、L鎖可変領域の相補性決定領域として下記の配列 (CDR1~CDR3) を有することを特徴とする。

(L-A)

CDR1: Lys-Ala-Ser-Gln-Asp-Val-Gly-Ala-Asp-Val-Ala

CDR2: Trp-Ala-Ser-Thr-Arg-His-Thr

CDR3: Gln-Gln-Tyr-Ser-Ser-Phe-Pro-Leu-Thr

または、

(L-B)

CDR1: Lys-Ala-Ser-Gln-Ser-Val-Asp-Tyr-Asp-Gly-Asp-Ser-Tyr-Met-Asn

CDR2: Ala-Ala-Ser-Asn-Leu-Glu-Ser

50 CDR3: Gln-Gln-Ser-Asn-Glu-Asp-Pro-Trp-Thr

【0016】さらに、本発明者らは、改変抗体を調製する際には、これまで報告されているように、上記の相補性決定領域のみマウス由来のアミノ酸配列に組換えるよりも、さらに相補性決定領域に隣接するフレーム（FR）領域の一部についてもマウス由来の配列に組換えることで、より本来の抗体活性を維持した組換え抗体が得られることを見いだした。

【0017】すなわち、H鎖可変領域遺伝子として上記（H-A）の相補性決定領域配列を利用する際には、可変領域の相補性決定領域CDR1に隣接するFR1のC末側1個のアミノ酸がスレオニン（Thr）であり、CDR2に隣接するFR2のC末側4個のアミノ酸配列が Lys-Trp-Met-Glyであり、CDR2に隣接するFR3のN末側5個のアミノ酸配列が Arg-Val-Thr-Met-Serであり、さらにCDR3に隣接するFR3のC末側1個のアミノ酸がアルギニン（Arg）であるH鎖可変領域遺伝子を調製することにより優れた効果を有する抗HIV改変抗体を調製することができる。同様に、H鎖可変領域遺伝子として上記（H-B）の相補性決定領域配列を利用する際には、可変領域の相補性決定領域CDR1に隣接するFR1のC末側1個のアミノ酸がスレオニン（Thr）であり、CDR2に隣接するFR2のC末側2個のアミノ酸配列が Ile-Glyであり、CDR2に隣接するFR3のN末側6個のアミノ酸配列が Lys-Ala-Thr-Met-Thr-Valであり、さらにCDR3に隣接するFR3のC末側1個のアミノ酸がスレオニン（Thr）であるH鎖可変領域遺伝子を調製することにより優れた効果を有する抗HIV改変抗体を調製することができる。また、L鎖可変領域遺伝子として上記（L-A）の相補性決定領域配列を利用する際には、可変領域の相補性決定領域CDR2に隣接するFR2のC末側1個のアミノ酸がセリン（Ser）であるL鎖可変領域遺伝子を調製することが好ましい。

【0018】このようにして調製される、本発明の抗HIV改変抗体のH鎖可変領域をコードする遺伝子の核酸配列およびアミノ酸配列の好ましい例としては、図9または図11に示された配列を挙げる事が出来る（図中、マウス由来のアミノ酸配列の領域を下線にて示す）。また、一方、本発明の抗HIV改変抗体のL鎖可変領域をコードする遺伝子の核酸配列およびアミノ酸配列の好ましい例としては、図10または図12に示された配列を挙げる事が出来る（図中、マウス由来のアミノ酸配列の領域を下線にて示す）。

【0019】一方、本発明に従い、抗HIVキメラ抗体を調製する際には、H鎖可変領域をコードする遺伝子の核酸配列およびアミノ酸配列として、図1または図3に示された配列がその好ましい一例として挙げられる。また、L鎖可変領域をコードする遺伝子の核酸配列およびアミノ酸配列としては、図2または図4に示された配列がその好ましい一例として挙げられる。

【0020】一方、抗HIV組換え抗体作製に用いられるヒト免疫グロブリンH鎖遺伝子並びにL鎖遺伝子の定

常領域（C）遺伝子は、例えば ヒト抗体産生細胞から同様の方法により単離することが出来る。また、C領域遺伝子はその遺伝子内で再配列を行わないので特にヒトC領域遺伝子を単離するためにヒト抗体産生細胞を使う必要はない。単離する方法としては、前述のマウスV領域遺伝子の単離の場合と同様にして行なうことができる。また、C領域遺伝子の種類としては、特に γ 1鎖、 κ 鎖に限ったものではなく、 μ 鎖、 α 鎖、 γ 2鎖、 γ 3鎖、 γ 4鎖、 ϵ 鎖、 λ 鎖の各鎖の遺伝子でも可能である。しかし、補体活性化能、抗体依存性細胞傷害活性を期待するならば、 γ 1鎖が望ましい。

【0021】抗HIV組換え抗体遺伝子は、H鎖遺伝子もL鎖遺伝子も、基本的に上記2種の遺伝子断片（V領域遺伝子とC領域遺伝子）を結合させることにより構築される。例えば、渡辺らによって既に示された方法 [渡辺ら, Cancer Research, 47, p999-1005, (1987)] や M. Bruggemann [Waldmann H (ed) Monoclonal Antibody Therapy. Prog Allergy. Basel, Karger, 1988, vol 45, pp 91] や S. L. Morrison [Advances in Immunology, 44, 65, (1989)] 等の総説に紹介されている方法に準じて行うことが出来る。また、発現させる宿主によって動物細胞発現系、大腸菌発現系、酵母細胞発現系などベクター系が異なるが、いずれの場合でも発現可能である。更に、DHFR等の遺伝子増幅系を使うことも可能である。

【0022】このようにして得られる本発明の組換え抗体は、HIVに対して中和活性を有していることが確認され、本発明によりこれまでになかった抗HIV組換え抗体を調製することが可能となった。このような抗HIV組換え抗体は、AIDSの臨床において、これまでになかった実質的に有効なAIDS治療剤となりうるものである。さらに、本発明により提供される抗HIV抗体可変領域をコードする遺伝子断片は、HIVに対して中和活性を有する抗体分子の可変領域の特異的なアミノ酸配列もしくは核酸塩基配列を開示するものであり、今後、さらに進んだ遺伝子組換え技術を応用して目的の抗体分子を修飾、または一部置換等することにより、より優れた抗HIV組換え抗体分子の開発を可能にするものである。

【0023】次に、実施例に従い、本発明をさらに詳細に説明するが、これにより本発明が限定されるものではない。

【0024】

【実施例】

(1) 抗HIVマウスモノクローナル抗体産生細胞の作製
抗HIVマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製方法は以下に示す通りである。免疫抗原として、HTLV-IIIMN株外皮膜糖蛋白質gp120のアミノ酸配列第303~325番目に対応する合成ペプチド（SP-1: YNKRKRIHIGPGRAFYYTKNIIG）及び合成ペプチドをKLH（キー

ホールリンペットヘモシアニン) と結合させたペプチド-KLHコンジュゲート、あるいはHTLV-IIIMN産生細胞(H9/HTLV-IIIMN) 培養上清よりシヨ糖密度勾配遠心により得たウイルス粒子、あるいはH9/HTLV-IIIMN培養液より得た細胞を1%トリトンX-100にて溶解後ConA-セファロース4BカラムとHIV抗体(IgG)-セファロース4Bカラムにてアフィニティー精製して得たgp120、さらにH9/HTLV-IIIMN細胞の高分子量DNA (genomic DNA) よりHTLV-IIIMN gp120 V3ドメイン(アミノ酸247-370) をコードするDNA断片をPCR法で増幅単離 [G. I. LaRosaら、Science Vol. 249 p932 (1990)] し、pUEX2 (アマシャム製) 発現ベクターを用いて大腸菌で発現させたHTLV-IIIMN gp120 V3ドメイン(アミノ酸247-370) β -ガラクトシダーゼ融合蛋白、等を組み合わせて使用した。これらの免疫原でBALB/cマウスを4回免疫後、脾細胞を採取し、P3X63Ag8-U1X63マウスミエローマ細胞 [ATCC CRL 1597] とポリエチレングリコール (シグマ社) を用いて細胞融合を行いクローニングした。得られたクローンの培養上清中の抗体の前述の免疫原への結合活性を酵素抗体法にて測定し、反応が陽性と思われるクローンについて、さらに、ウェスタンブロット法及び間接蛍光法を用いて確認し、抗HIVモノクローナル抗体、 μ 39.1あるいは μ 5.5を産生するハイブリドーマを確立した [特願平2-188300、寄託番号: μ 39.1 (微工研菌寄第11472号)、 μ 5.5 (微工研条寄第3402号)]。これらの抗体はSP-1ペプチドに結合し、HIV感染細胞と非感染CD4陽性細胞間の合体形成 (syncytium formation) を抑制する。さらに、これらの抗体とHIVウイルスを混和し細胞(H9)へ感染させるウイルス中和試験においても中和活性を確認している。以下に述べる本発明の抗HIV組換え抗体のV領域遺伝子の調製には、該中和活性を有するこれらの抗HIVマウスモノクローナル抗体を産生する細胞(μ 39.1、 μ 5.5細胞)を使用した。

【0025】(2) 抗HIV抗体マウスV領域遺伝子の単離

マウス免疫グロブリン可変(V)領域遺伝子の単離については以下に行った。 μ 39.1、 μ 5.5細胞から常法 [D. M. Glover編集 "DNA cloning Vol. I" IRLpress (1985)] に従って全RNAを抽出し、cDNA合成システム・プラス (アマシャム) を用いて1本鎖cDNAを合成した。この1本鎖cDNAを鋳型に、Kabatら [Sequence of Proteins of Immunological Interest 4th ed., Public Health Service, NIH, Washington DC, 1987] の分類したV領域とJ領域の核酸塩基配列をもとにして合成したDNAプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行なった。V領域プライマーとJ領域プライマーにはそれぞれHindIIIとBamHIサイトが付加されている。PCRはシータス社のプロトコールに従って行なった。すなわち、これらのプライマーはともに100 pmol 使い、PCRの試薬はCETUS社のキットを使用した。

PCRの条件は、94℃1分、55℃1分、72℃1分で25サイクル行なった。PCR後、得られたDNA断片をpUC18 (宝酒造製; 以下本実施例で使用した試薬は特に断りのない限り宝酒造製あるいは東洋紡製を使用した) のHincI Iサイトへサブクローニングした。

【0026】(3) 抗HIV抗体マウスV領域遺伝子の核酸塩基配列

東洋紡社のシークナーゼVer. 2キットを用いて、pUC18に組み込まれたV領域遺伝子をシークエンスした。その結果得られた μ 39.1、 μ 5.5の核酸塩基配列を図1から図4に示す。また、その核酸塩基配列から得られるアミノ酸配列についても同様に図1から図4に示す。 μ 39.1、 μ 5.5のいずれの核酸塩基配列もV領域遺伝子特有の再配列を起こしており、しかも発現可能なオープンリーディングフレーム(ORF)をとっていた。

【0027】(4) 抗HIVキメラ抗体の作製

(2)で単離された μ 39.1、 μ 5.5 V領域遺伝子が本当に抗HIV活性を担うV領域をコードする遺伝子であるかどうかを確認するために、マウス-ヒトキメラ抗体が作製された。キメラ抗体の発現のためにヒトサイトメガロウイルス(HCMV)のエンハンサー、プロモーター [N. Whittle, et al., Protein Engineering, 1, 499 (1987)] を持った発現ベクター HCMV- κ , HCMV- γ 1 がそれぞれ使われた。HCMV- κ はヒト κ 鎖定常領域遺伝子を持ち HCMV- γ 1 はヒト γ 鎖定常領域遺伝子を持つ。前述の(2)で調製された μ 39.1 V領域をHindIIIとBamHI制限酵素で消化し、VH、VL断片をそれぞれ HCMV- γ 1、HCMV- κ のHindIII-BamHIサイトに組み込んだ。 μ 39.1キメラ抗体遺伝子発現ベクター(それぞれCH μ 39.1、CL μ 39.1)の構造を図5、図6に示す。また、 μ 5.5 VH、VL領域遺伝子も、 μ 39.1の場合と同様にして、HCMV- γ 1、HCMV- κ にそれぞれ組み込んだ(それぞれCH μ 5.5、CL μ 5.5; 図5、図6参照)。

【0028】(5) 抗HIVキメラ抗体の発現

上記のように構築した μ 39.1あるいは μ 5.5キメラ抗体遺伝子の持つ抗体活性をCOS7細胞 [ATCC CRL 1651] を用いた一時的発現系で検討した。CH μ 39.1及びCL μ 39.1プラスミドDNAの混合物、あるいはCH μ 5.5及びCL μ 5.5プラスミドDNAの混合物をBio-Rad社製のElectroporation装置を用いて、Boi-Rad社のプロトコールにしたがってCOS7細胞に導入し、10%牛胎児血清を含むDMEM培地 (GIBCO社) で培養した。3日後その培養上清を回収し、抗ヒトIgGあるいはSP-1抗原ペプチドを用いたELISA法によりその培養上清に存在する抗体の活性を測定した。その結果図7に示すように、CH μ 39.1及びCL μ 39.1プラスミドDNAの混合物、あるいはCH μ 5.5及びCL μ 5.5プラスミドDNAの混合物のいずれの発現産物もSP-1ペプチドに結合した。従って(2)で単離した μ 39.1、 μ 5.5 V領域遺伝子は間違いなく抗HIV活性を持った抗体のV領域をコードしている遺伝子であることが確認され

14

*ンを選んだ。さらに、2次スクリーニングとして、1次スクリーニングで得られたクローンよりプラスミドを調製しシークナーゼキット（東洋紡）を用いてシークエンスを行ない、正確にCDR移植が出来ていることを確認した。このようにして改変された μ 39.1、 μ 5.5のV領域（それぞれRH μ 39.1、RL μ 39.1、RH μ 5.5、RL μ 5.5：図8～図11参照）を得た。これらの改変V領域断片を(4)のキメラ抗体の作製と同様にしてHindIIIとBamHI制限酵素で消化し、VH、VL断片をそれぞれ HCMV- γ 1、HCMV- κ のHindIII-BamHI サイトに組み込んだ。このようにして μ 39.1改変抗体遺伝子発現ベクター（それぞれRH μ 39.1、RL μ 39.1）、及び μ 5.5改変抗体遺伝子発現ベクター（それぞれRH μ 5.5、RL μ 5.5）が調製された。

【0030】(7) 抗HIV改変抗体の発現

この改変 μ 39.1、 μ 5.5 抗体遺伝子によって得られる抗体活性を前述の COS7 細胞における一時的発現系で検討した。(5)の場合と同様にして遺伝子導入細胞の培養上清を回収、抗ヒト IgG あるいは SP-1 ペプチドを用いた ELISA 法によりその培養上清に存在する抗体の活性を測定した。その結果図 7 に示すように、RH μ 39.1 及び RRL μ 39.1 プラスミド DNA の混合物、あるいは RH μ 5.5 及び RRL μ 5.5 プラスミド DNA の混合物の発現産物のいずれもが SP-1 ペプチドに結合した。従って図 9 ~ 図 12 で示された μ 39.1、 μ 5.5 のアミノ酸配列の中で移植 CDR 領域は抗 HIV 活性を担う重要な領域であることが確認された。この結果から、これらの領域をコードする遺伝子は組換え抗 HIV 抗体を作製するにあたり、極めて有用な遺伝子であることが確認された。

配列の長さ： 3 5 7

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類: cDNA to genomic RNA

配列の特徴

起源

生物名：マウス

CAG	ATC	CAG	ATG	GTG	CAG	TCT	GGA	CCT	GAG	TTG	AAG	AAG	CCT	GGA	GAG	48
Gln	Ile	Gln	Met	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	
1			5					10					15			
ACA	GTC	AAG	ATC	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGG	TAT	ACC	TTC	ACA	AAA	TAT	96
Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Lys	Tyr	
			20					25					30			
GGA	ATG	AAC	TGG	GTG	AAA	CAG	ACT	CCA	GGA	AAG	GGT	TTA	AAG	TGG	ATG	144
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Lys	Trp	Met	
			35				40					45				
GGC	TGG	AAA	AAC	ACC	AAT	ACT	GGA	GAG	GCA	ACA	CAT	GTT	GAA	GAG	TTC	192

15 16
 Gly Trp Lys Asn Thr Asn Thr Gly Glu Ser Thr His Val Glu Glu Phe
 50 55 60
 AAG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA ACC TCT GCC AGT ACT GCC TAT 240
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 TTG CAG ATC AAC AAC CTC AAA AAT GAG GAC ACG GCT ACA TAT TTC TGT 288
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 GCA AGA GAA TAT GAT TAC GAC GGG GGC TTT TCT TAC TGG GGC CAA GGG 336
 Ala Arg Glu Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

【0032】配列番号：2

配列の長さ：321

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：cDNA to genomic RNA

配列の特徴

起源

生物名：マウス

*

配列

GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAC AAA TTC ATG TCC ACA TCA GTA GGA 48
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 GAC AGG GTC AGC ATC ACC TGC AAG GCC AGT CAG GAT GTG GGT GCT GAT 96
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ala Asp
 20 25 30
 GTA GCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA CAA TCT CCT AAA CAA CTG ATT 144
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Gln Leu Ile
 35 40 45
 TCC TGG GCA TCC ACC CGG CAC ACT GGA GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC 192
 Ser Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATT ACC AAT GTG CAG TCT 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80
 GAA GAC TTG GCA GAT TAT TTC TGT CAG CAA TAT AGC AGC TTT CCT CTC 288
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Pro Leu
 85 90 95
 ACG TTC GGT ACT GGG ACC AAG TTG GAG CTG AGA 321
 Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg
 100 105

【0033】配列番号：3

配列の長さ：354

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：cDNA to genomic RNA

配列の特徴

起源

生物名：マウス

※

配列

GAG GTC CAG CTG CAA CAG TCT GGG CCT GAC CTG GTG AAG CCT GGG GCT 48
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 50 15

17 18
TCA GTG AAG ATA TCC TGC AAG ACT TCT GGA TAC ACA TTC ACT GAA TAC 96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30
ACC ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGC CAT GGA AGG AGC CTT GAG TGG ATT 144
Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Arg Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
GGA GGT ATT AAT CCT AAC AAT GGT GAT ACT AGC TAC ACC CAG AAG TTC 192
Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Thr Gln Lys Phe
50 55 60
AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAG TCC TCC AGC ACA GCC TAC 240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
ATG GAG CTC CGC AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTC TAT TAC TGT 288
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
GCA ACA CCC TAC TAT GCC TAT GCT ATT GAC TCC TGG GGT CAA GGA ACC 336
Ala Thr Pro Tyr Tyr Ala Tyr Ala Ile Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
TCA GTC ACC GTC TCC TCA 354
Ser Val Thr Val Ser Ser
115

【0034】配列番号：4

配列の長さ：333

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：cDNA to genomic RNA

配列の特徴

起源

生物名：マウス

*

配列

GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG 48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT 96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30
GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC 144
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
AAA CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT GGG ATC CCA GCC 192
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60
AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT 240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80
CCT GTG GAG GAG GAG GAT GGT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT 288
Pro Val Glu Glu Glu Asp Gly Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95
GAG GAT CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA 333
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

【0035】配列番号：5

配列の長さ：357

※配列の型：核酸

※50 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

* 起源

配列の種類：その他の核酸（合成核酸）

生物名：マウスおよびヒト

配列の特徴

*

配列

CAG GTG CAA CTA GTG CAG TCC GGC GCC GAA GTG AAG AAA CCC GGT GCT 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 TCC GTG AAG GTG AGC TGT AAA GCT AGC GGT TAT ACC TTC ACA AAA TAT 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Tyr
 20 25 30
 GGA ATG AAC TGG GTT AGA CAG GCC CCA GGC CAA GGG CTC AAG TGG ATG 144
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 GGC TGG AAA AAC ACC AAT ACT GGA GAG TCA ACA CAT GTT GAG GAG TTT 192
 Gly Trp Lys Asn Thr Asn Thr Gly Glu Ser Thr His Val Glu Glu Phe
 50 55 60
 AAG GGC AGG GTT ACC ATG TCC TTG GAC ACC TCT ACA AAC ACC GCC TAC 240
 Lys Gly Arg Val Thr Met Ser Leu Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 ATG GAA CTG TCC AGC CTG CGC TCC GAG GAC ACT GCA GTT TAC TAC TGC 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 GCC AGA GAA TAT GAT TAC GAC GGC GGC TTC TCC TAT TGG GGA CAG GGT 336
 Ala Arg Glu Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 ACC CTT GTC ACC GTC AGT TCA 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

【0036】配列番号：6

※配列の種類：その他の核酸（合成核酸）

配列の長さ：321

30 配列の特徴

配列の型：核酸

起源

鎖の数：二本鎖

生物名：マウスおよびヒト

トポロジー：直鎖状

※

配列

GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC AGC GTG GGT 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAA GCC AGC CAG GAT GTG GGT GCT GAT 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ala Asp
 20 25 30
 GTA GCT TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC 144
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 TCC TGG GCA TCC ACC CGG CAC ACT GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT 192
 Ser Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 GAG GAC ATC GCC ACA TAC TAC TGC CAA5CAA TAT AGC AGC TTT CCA CTC 288

21

22

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Pro Leu

85

90

95

ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

321

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

【0037】配列番号：7

配列の長さ：354

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：その他の核酸（合成核酸）

配列の特徴

起源

生物名：マウスおよびヒト

* 10

配列

CAG GTG CAA CTA GTG CAG TCC GGC GCC GAA GTG AAG AAA CCC GGT GCT 48

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

TCC GTG AAG GTG AGC TGT AAA GCT AGC GGT TAT ACC TTC ACT GAA TAC 96

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr

20

25

30

ACC ATG CAT TGG GTT AGA CAG GCC CCA GGC CAA GGG CTC GAG TGG ATT 144

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

GGC GGT ATT AAC CCT AAC AAT GGC GAT ACA AGC TAT ACC CAG AAG TTT 192

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Thr Gln Lys Phe

50

55

60

AAG GGC AAG GCT ACC ATG ACC GTA GAC ACC TCT ACA AAC ACC GCC TAC 240

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

ATG GAA CTG TCC AGC CTG CGC TCC GAG GAC ACT GCA GTT TAC TAC TGC 288

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

GCC ACA CCC TAC TAC GCC TAC GCT ATT GAC TCC TGG GGA CAG GGT ACC 336

Ala Thr Pro Tyr Tyr Ala Tyr Ala Ile Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

CTT GTC ACC GTC AGT TCA

354

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

【0038】配列番号：8

配列の長さ：333

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：その他の核酸（合成核酸）

配列の特徴

起源

生物名：マウスおよびヒト

※ 40

配列

GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC AGC GTG GGT 48

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT 96

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp

20

25

30

GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA 144

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

35

40

50

45

23																24
AAG	CTG	CTG	ATC	TAC	GCT	GCA	TCC	AAT	CTA	GAA	TCT	GGT	GTG	CCA	AGC	192
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
50				55				60								
AGA	TTC	AGC	GGT	AGC	GGT	AGC	GGT	ACC	GAC	TTC	ACC	TTC	ACC	ATC	AGC	240
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	
65				70				75				80				
AGC	CTC	CAG	CCA	GAG	GAC	ATC	GCC	ACC	TAC	TAC	TGC	CAG	CAA	AGT	AAT	288
Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn	
85				90				95								
GAG	GAC	CCA	TGG	ACG	TTC	GGC	CAA	GGG	ACC	AAG	GTG	GAA	ATC	AAA		333
Glu	Asp	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys		
100				105				110								

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例(3)で示した抗HIV中和抗体 μ 39.1のH鎖可変領域をコードする本発明のDNA断片の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

【図2】 実施例(3)で示した抗HIV中和抗体 μ 39.1のL鎖可変領域をコードする本発明のDNA断片の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

【図3】 実施例(3)で示した抗HIV中和抗体 μ 5.5のH鎖可変領域をコードする本発明のDNA断片の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

【図4】 実施例(3)で示した抗HIV中和抗体 μ 5.5のL鎖可変領域をコードする本発明のDNA断片の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

【図5】 実施例(4)で構築した抗HIVキメラ抗体H鎖発現プラスミドCH μ 39.1およびCH μ 5.5の構造を示す。

【図6】 実施例(4)で構築した抗HIVキメラ抗体L鎖発現プラスミドCL μ 39.1およびCL μ 5.5の構造を示す。

【図7】 実施例(5)で測定した抗HIVキメラ抗体 μ 39.1および実施例(7)で測定した抗HIV改変抗体 μ 39.1 *

*の抗HIV活性を示す。

【図8】 実施例(5)で測定した抗HIVキメラ抗体 μ 5.5および実施例(7)で測定した抗HIV改変抗体 μ 5.5の抗HIV活性を示す。

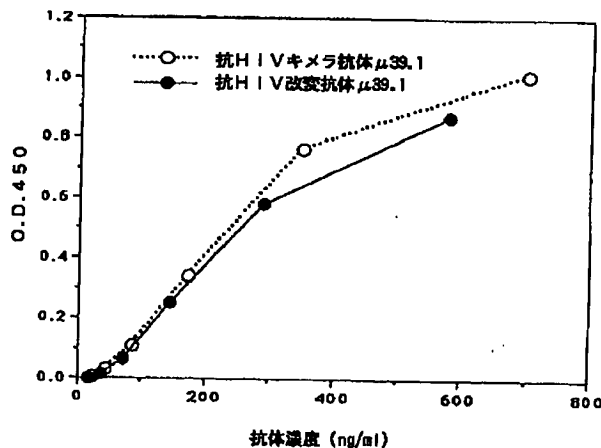
【図9】 実施例(6)で調製した抗HIV改変抗体 μ 39.1H鎖の可変領域をコードするDNA断片の核酸配列およびアミノ酸配列を示す（下線部分の配列がマウス抗体由来のアミノ酸配列を示す）。

【図10】 実施例(6)で調製した抗HIV改変抗体 μ 39.1L鎖の可変領域をコードするDNA断片の核酸配列およびアミノ酸配列を示す（下線部分の配列がマウス抗体由来のアミノ酸配列を示す）。

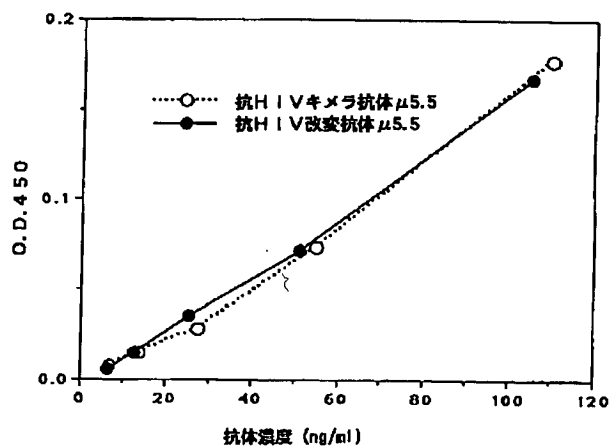
【図11】 実施例(6)で調製した抗HIV改変抗体 μ 5.5H鎖の可変領域をコードするDNA断片の核酸配列およびアミノ酸配列を示す（下線部分の配列がマウス抗体由来のアミノ酸配列を示す）。

【図12】 実施例(6)で調製した抗HIV改変抗体 μ 5.5L鎖の可変領域をコードするDNA断片の核酸配列およびアミノ酸配列を示す（下線部分の配列がマウス抗体由来のアミノ酸配列を示す）。

【図7】



【図8】



【図1】

| FR1
1 CAGATCCAGATGGTGCAGTCTGGACCTGAGTTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATC
GlnIleGlnMetValGlnSerGlyProGluLeuLysLysProGlyGluThrValLysIle

| CDR1 | FR2
61 TCCTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAAAATATGGAATGAACTGGGTGAAACAGACT
SerCysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrLysTyrGlyMetAsnTrpValLysGlnThr

| CDR2
121 CCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGAAAAACACCAATACTGGAGAGTCAACACAT
ProGlyLysGlyLeuLysTrpMetGlyTrpLysAsnThrAsnThrGlyGluSerThrHis

| FR3
181 GTTGAAGAGTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGTACTGCCTAT
ValGluGluPheLysGlyArgPheAlaPheSerLeuGluThrSerAlaSerThrAlaTyr

|
241 TTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAGAGAATAT
LeuGlnIleAsnAsnLeuLysAsnGluAspThrAlaThrTyrPheCysAlaArgGluTyr

CDR3 | FR4
301 GATTACGACGGGGGCTTTTCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
AspTyrAspGlyGlyPheSerTyrTrpGlyGlnGlyThrLeuValThrValSerAla

【図2】

| FR1
1 GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGC
AspIleValMetThrGlnSerHisLysPheMetSerThrSerValGlyAspArgValSer

| CDR1 | FR2
61 ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTGCTGATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCA
IleThrCysLysAlaSerGlnAspValGlyAlaAspValAlaTrpTyrGlnGlnLysPro

| CDR2 | FR3
121 GGACAATCTCCTAAACAACCTGATTTCTGGGCATCCACCCGGCAGTGGAGTCCCTGAT
GlyGlnSerProLysGlnLeuIleSerTrpAlaSerThrArgHisThrGlyValProAsp

181 CGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATTACCAATGTGCAGTCT
ArgPheThrGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuThrIleThrAsnValGlnSer

| CDR3 | FR4
241 GAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTCAGCAATATAGCAGCTTTCCTCTCACGTTCCGGTACT
GluAspLeuAlaAspTyrPheCysGlnGlnTyrSerSerPheProLeuThrPheGlyThr

301 GGGACCAAGTTGGAGCTGAGA
GlyThrLysLeuGluLeuArg

【図3】

| FR1
1 GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGGCCTGACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATA
GluValGlnLeuGlnGlnSerGlyProAspLeuValLysProGlyAlaSerValLysIle

| CDR1 | FR2
61 TCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCACTGAATACACCATGCACTGGGTGAAGCAGAGC
SerCysLysThrSerGlyTyrThrPheThrGluTyrThrMetHisTrpValLysGlnSer

| CDR2
121 CATGGAAGGAGCCTTGAGTGGATTGGAGGTATTAATCCTAACAATGGTGATACTAGCTAC
HisGlyArgSerLeuGluTrpIleGlyGlyIleAsnProAsnAsnGlyAspThrSerTyr

| FR3
161 ACCCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCCAGCACAGCCTAC
ThrGlnLysPheLysGlyLysAlaThrLeuThrValAspLysSerSerSerThrAlaTyr

|
241 ATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAACACCCTAC
MetGluLeuArgSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrTyrCysAlaThrProTyr

CDR3 | FR4
301 TATGCCTATGCTATTGACTCCTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
TyrAlaTyrAlaIleAspSerTrpGlyGlnGlyThrSerValThrValSerSer

【図4】

| FR1
1 GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACC
AspIleValLeuThrGlnSerProAlaSerLeuAlaValSerLeuGlyGlnArgAlaThr

| CDR1 | FR2
61 ATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAGTTATATGAACTGGTAC
IleSerCysLysAlaSerGlnSerValAspTyrAspGlyAspSerTyrMetAsnTrpTyr

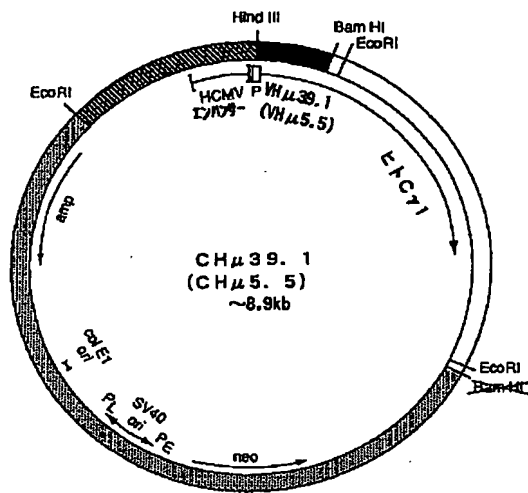
| CDR2
121 CAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCT
GlnGlnLysProGlyGlnProProLysLeuLeuIleTyrAlaAlaSerAsnLeuGluSer

| FR3
181 GGGATCCCAGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCAT
GlyIleProAlaArgPheSerGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuAsnIleHis

| CDR3
241 CCTGTGGAGGAGGAGGATGGTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCGTGG
ProValGluGluGluAspGlyAlaThrTyrTyrCysGlnGlnSerAsnGluAspProTrp

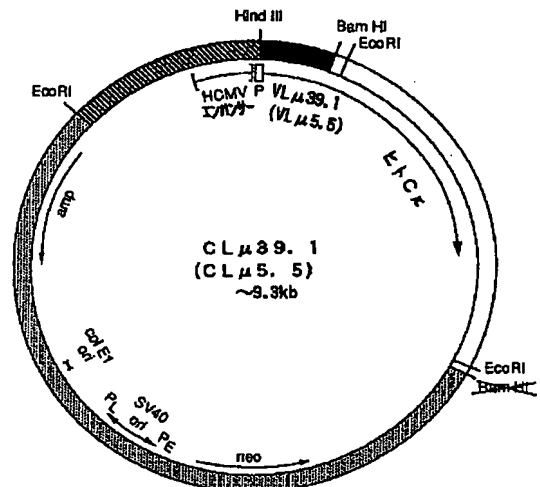
| FR4
301 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
ThrPheGlyGlyGlyThrLysLeuGluIleLys

【図5】



■ マウスVH遺伝子断片
 □ ヒトC γ 1遺伝子断片
 ▨ HCMV
 ▩ pSV2neo

【図6】



■ マウスVL遺伝子断片 d Human
 □ ヒトC κ 遺伝子断片
 ▨ HCMV
 ▩ pSV2neo

【図9】

| FR1
1 CAGGTGCAACTAGTGCAGTCCGGCGCCGAAGTGAAGAAACCGGTGCTTCCGTGAAGGTG
GlnValGlnLeuValGlnSerGlyAlaGluValLysLysProGlyAlaSerValLysVal

| CDR1 | FR2
61 AGCTGTAAAGCTAGCGGTTATACCTTCACAAAATATGGAATGAACTGGGTTAGACAGGCC
SerCysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrLysTyrGlyMetAsnTrpValArgGlnAla

| CDR2
121 CCAGGCCAAGGGCTCAAGTGGATGGGCTGGAAAAACACCAATACTGGAGAGTCAACACAT
ProGlyGlnGlyLeuLysTrpMetGlyTrpLysAsnThrAsnThrGlyGluSerThrHis

| FR3
181 GTTGAGGAGTTTAAGGGCAGGGTTACCATGTCCTTGGACACCTCTACAAACACCGCCTAC
ValGluGluPheLysGlyArgValThrMetSerLeuAspThrSerThrAsnThrAlaTyr

|
241 ATGGAAGTGTCCAGCCTGCGCTCCGAGGACACTGCAGTTTACTACTGCGCCAGAGAATAT
MetGluLeuSerSerLeuArgSerGluAspThrAlaValTyrTyrCysAlaArgGluTyr

CDR3 | FR4
301 GATTACGACGGGGGCTTCTCCTATTGGGGACAGGGTACCCTTGTACCGTCAGTTCA
AspTyrAspGlyGlyPheSerTyrTrpGlyGlnGlyThrLeuValThrValSerSer

【図10】

| FR1

1 GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGACC
AspIleGlnMetThrGlnSerProSerSerLeuSerAlaSerValGlyAspArgValThr

| CDR1

| FR2

61 ATCACCTGTAAAGCCAGCCAGGATGTGGGTGCTGATGTAGCTTGGTACCAGCAGAAGCCA
IleThrCysLysAlaSerGlnAspValGlyAlaAspValAlaTrpTyrGlnGlnLysPro

| CDR2

| FR3

121 GGTAAGGCTCCAAAGCTGCTGATCTCCTGGGCATCCACCCGGCACACTGGTGTGCCAAGC
GlyLysAlaProLysLeuLeuIleSerTrpAlaSerThrArgHisThrGlyValProSer

181 AGATTTCAGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTTCACCTTCACCATCAGCAGCCTCCAGCCA
ArgPheSerGlySerGlySerGlyThrAspPheThrPheThrIleSerSerLeuGlnPro

| CDR3

| FR4

241 GAGGACATCGCCACATACTACTGCCAACAATATAGCAGCTTCCACTCACGTTCCGCCAA
GluAspIleAlaThrTyrTyrCysGlnGlnTyrSerSerPheProLeuThrPheGlyGln

301 GGGACCAAGGTGGAAATCAAA
GlyThrLysValGluIleLys

【図11】

| FR1
1 CAGGTGCAACTAGTGCAGTCCGGCGCCGAAGTGAAGAAACCGGTGCTTCCGTGAAGGTG
GlnValGlnLeuValGlnSerGlyAlaGluValLysLysProGlyAlaSerValLysVal

| CDR1 | FR2
61 AGCTGTAAAGCTAGCGGTTATACCTTCACTGAATACACCATGCATTGGGTTAGACAGGCC
SerCysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrGluTyrThrMetHisTrpValArgGlnAla

| CDR2
121 CCAGGCCAAGGGCTCGAGTGGATTGGCGGTATTAACCCTAACAATGGCGATACAAGCTAT
ProGlyGlnGlyLeuGluTrpIleGlyGlyIleAsnProAsnAsnGlyAspThrSerTyr

| FR3
181 ACCCAGAAGTTTAAGGGCAAGGCTACCATGACCGTAGACACCTCTACAAACACCGCCTAC
ThrGlnLysPheLysGlyLysAlaThrMetThrValAspThrSerThrAsnThrAlaTyr

|
241 ATGGAAGTGTCCAGCCTGCGCTCCGAGGACACTGCAGTTTACTACTGCGCCACACCCTAC
MetGluLeuSerSerLeuArgSerGluAspThrAlaValTyrTyrCysAlaThrProTyr

CDR3 | FR4
301 TACGCCTACGCTATTGACTCCTGGGGACAGGGTACCCTTGTCACCGTCAGTTCA
TyrAlaTyrAlaIleAspSerTrpGlyGlnGlyThrLeuValThrValSerSer

【図12】

| FR1
 1 GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGACC
 AspIleGlnMetThrGlnSerProSerSerLeuSerAlaSerValGlyAspArgValThr

| CDR1 | FR2
 61 ATCACCTGTAAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAGTTATATGAAGTGGTAC
 IleThrCysLysAlaSerGlnSerValAspTyrAspGlyAspSerTyrMetAsnTrpTyr

| CDR2
 121 CAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTCCAAAGCTGCTGATCTACGCTGCATCCAATCTAGAATCT
 GlnGlnLysProGlyLysAlaProLysLeuLeuIleTyrAlaAlaSerAsnLeuGluSer

| FR3
 181 GGTGTGCCAAGCAGATTCAGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTTCACCTCACCATCAGC
 GlyValProSerArgPheSerGlySerGlySerGlyThrAspPheThrPheThrIleSer

| CDR3
 241 AGCCTCCAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAGCAAAGTAATGAGGACCCATGG
 SerLeuGlnProGluAspIleAlaThrTyrTyrCysGlnGlnSerAsnGluAspProTrp

| FR4
 301 ACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAA
ThrPheGlyGlnGlyThrLysValGluIleLys

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

// (C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

(72)発明者 長富 深

熊本県熊本市竜田町上立田1687-5 パナハ
 イツ102号

(72)発明者 時吉 幸男

熊本県熊本市若葉3丁目14-19